

# 反义技术应用在细菌代谢调控中的研究进展

李强, 徐鑫, 杨建明, 聂庆娟, 咸漠

中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 青岛 266071

**摘 要:** 随着基因工程技术的蓬勃发展和代谢调控研究的深入, 反义技术作为一种温和调控的基因工程技术, 开始向世人展示其无穷的魅力。与基因敲除等功能缺失性研究方法相比, 反义技术具有投入少、周期短、操作简单等优点, 受到广泛的关注, 成为细菌代谢调控的有力工具。以下对反义 RNA、反义寡核苷酸、核酶这几种反义技术在细菌代谢工程操作中的研究进展及存在的问题进行了概述。

**关键词:** 反义技术, 代谢调控, 细菌, 反义 RNA, 反义寡核苷酸, 核酶

## Progress of Antisense Technology Applied in Metabolic Regulation of Bacteria

Qiang Li, Xin Xu, Jianming Yang, Qingjuan Nie, and Mo Xian

*Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China*

**Abstract:** With the rapid development of genetic engineering and metabolic regulation, antisense technology displays its fascination to the world as a mild regulation genetic tool. Compared with other loss-of-function research methods (e.g. gene knockout), antisense technologies have advantages such as low cost, short period, and easy operation. It has been increasingly used in bacterial metabolic regulation as a powerful genetic tool. This review briefly summarized the latest progress and problems in antisense technologies that are recently used in metabolic engineering of bacteria, and compares the advantages and disadvantages of these technologies.

**Keywords:** antisense technology, metabolic regulation, bacteria, antisense RNA, antisense oligonucleotides, ribozyme

细菌以其易于培养、酶种类多样、代谢产物丰富等优点受到代谢工程研究者的青睐。随着基因工程技术的飞速发展, 作为良好的表达宿主和基因改造宿主, 细菌的代谢调控研究受到越来越多的重视。近年来的研究发现, 在细菌中进行代谢途径改造和基因敲除可能带来代谢紊乱, 生长缓慢, 代谢产物产量不稳定等问题<sup>[1-3]</sup>, 因此, 反义技术这样较温和的代谢调控手段, 受到专家学者的极大关注。

经过 30 年来的不断改进和创新, 如今反义寡核苷酸、反义 RNA 等反义技术已经成功地用于抑制细菌基因的表达。反义技术已经成为细菌代谢工程操作中的强有力的工具, 应用越来越广泛。与基因敲除技术相比, 反义技术投入少、周期短、操作简单, 并且不阻断正常代谢通路, 对细胞生长和代谢影响较小。这些优点吸引着广大的代谢工程研究者, 反义技术在细菌中的应用研究越来越多, 得到了可喜

Received: March 18, 2008; Accepted: June 2, 2008

Supported by: the Knowledge Innovation Project of Chinese Academy of Sciences (No. KG CX2-YW-801).

Corresponding author: Mo Xian. +86-532-80662768; E-mail: xianmo@qibebt.ac.cn

中国科学知识创新工程项目(No. KG CX2-YW-801)资助。

的科研成果。

人们对于反义技术的认识始于 1978 年, Zamecnik<sup>[4]</sup>等人最早用反义技术构建了 13nt 的反义 RNA 用于抑制了劳氏肉瘤病毒的复制。之后随着分子生物学的蓬勃发展,反义技术在细菌中得到了广泛的研究和应用。大肠杆菌等几种细菌的基因敲除技术比较成熟,只有在基因难以敲除时人们才尝试用反义技术。因此过去反义技术多用于革兰氏阳性菌和少数几种革兰氏阴性菌的代谢调控。近年来基因敲除技术的缺点日益凸显,反义技术也逐渐应用于大肠杆菌等细菌的代谢调控中。

## 1 应用于细菌的反义技术

反义技术包括:反义 RNA、反义寡核苷酸、核酶、RNAi。目前适用于细菌的反义技术主要有反义 RNA、反义寡核苷酸、核酶。反义技术的作用原理是与目的基因、mRNA 结合,从而达到抑制基因表达的目的(图 1)。

### 1.1 反义 RNA(Antisense RNA)

反义 RNA 是 20 世纪 80 年代生命科学研究中的重大发现,在科学史上具有深远意义。反义 RNA 是一段本身不被翻译的 RNA 序列。反义 RNA 对基因表达的调控是细菌天然的代谢调控方式之一。1981 年在大肠杆菌的质粒 ColE1 的复制调控中,人们最早发现了细菌中反义 RNA 的存在<sup>[3]</sup>。反义技术的早期应用也主要是对细菌质粒的调控。在细菌代谢调控的实际操作中,反义 RNA 技术就是将一段编码反义 RNA 的核酸片段连接表达载体,导入到细胞中使其表达。然后,反义 RNA 与靶 RNA 碱基配对,形成二级结构,mRNA 被降解,从而抑制靶基因的表达,达到代谢调控的目的。

细菌体内本身存在反义 RNA 调控机制,因此在细菌中利用反义 RNA 用于基因表达调控有很多优点:(1)与基因敲除相比,对细胞的正常生长影响较小;(2)可在菌体达到一定生物量时诱导表达<sup>[5]</sup>,达到既抑制基因的表达,又不影响细菌的正常生长的目

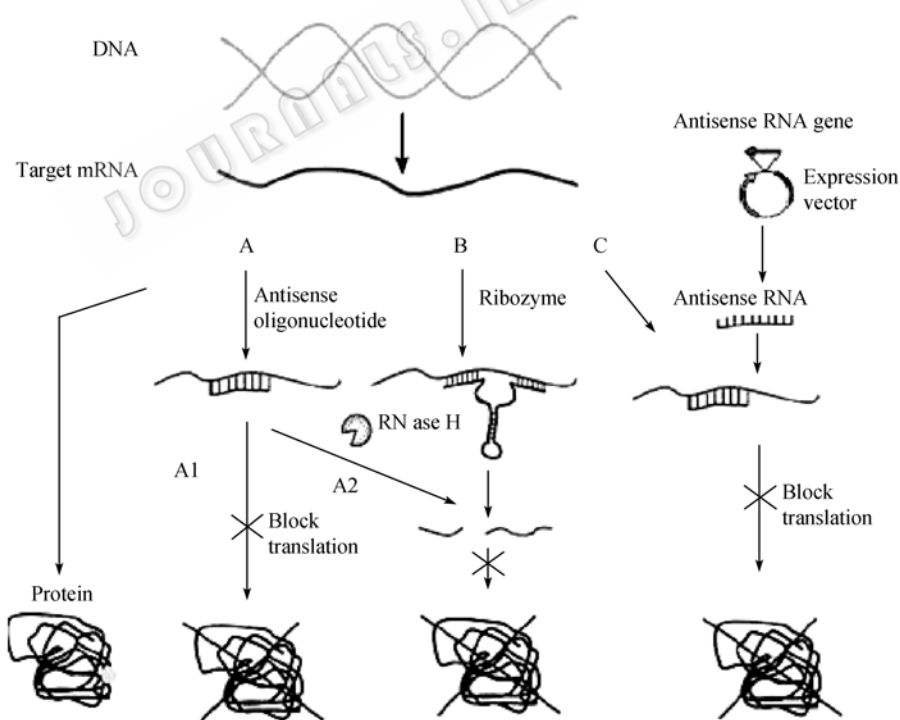


图 1 应用于细菌中的反义分子介导的基因表达抑制机理

Fig. 1 Mechanism of antisense technology applied in bacterial metabolic regulation

Route A: a fragment of antisense oligonucleotide possessing a sequence complementary to that of the target mRNA is transferred to the host cell, forms a duplex complex with the complementary mRNA sequences, and blocks mRNA translation via (A1) translational arrest or (A2) mRNA cleavage by RNase H. Route B: ribozyme is delivered to the host cell, forms specific complementary structure, hybridizes with target mRNA, and cleaves mRNA to fragments. Route C: antisense RNA strategy is to endogenously express antisense RNA through recombinant plasmids harboring antisense RNA gene. Then the antisense RNA forms a duplex complex with the complementary mRNA sequence and blocks translation by the ribosome

的,因而可以定时、有效地调控蛋白表达;(3)可持续稳定地表达反义 RNA 分子;(4)可选择性地抑制基因表达。反义 RNA 抑制基因表达的效率和反义分子的长度、作用位点、细胞因子的作用与正义 RNA 形成的空间结构密切相关。因此可以设计不同长度的反义 RNA、使反义 RNA 与目的 RNA 形成不同的配对,以不同的抑制效果针对目的 mRNA 上不同位点设计反义 RNA 来调节基因的表达。

反义 RNA 的操作简便,在细菌代谢调控中的应用通常是 PCR 扩增出部分目的 DNA,并在两端加上限制性酶切位点倒向插入原核表达载体中,然后转化入宿主菌表达。反义 RNA 技术在代谢途径的分析和调控中得到了广泛的应用,比较突出的成果表现在丙酮丁醇梭菌的溶剂产生代谢途径的调控当中。E.T. Papoutsakis 等<sup>[6]</sup>用反义 RNA 技术调控梭菌中基因的表达,经过检测,他们所构建的不同长度的反义 RNA 可在 35%~96%的效率范围内抑制丙酮和丁醇途径中一系列基因的表达。

反义 RNA 技术不仅在革兰氏阳性细菌得到了成功的应用,而且还在革兰氏阴性菌方面也取得了很多成果。Engdahl HM 等<sup>[7]</sup>在大肠杆菌中构建了反义 RNA 的基因沉默系统,为在大肠杆菌中进行反义操作打下了基础。Christian Kemmer 等<sup>[8]</sup>用反义 RNA 的方法弱化大肠杆菌细胞中不可缺少的酶 RNaseE 的表达,在诱导反义 RNA 表达 90 min 时,检测 RNaseE 的含量减少到原来的 35%,即抑制了 65%的表达量。Engdahl 和 Christian 等人的工作表明反义 RNA 技术对于大肠杆菌代谢调控也十分有效。

研究表明,反义 RNA 技术可在 0%~99%的效率范围内抑制基因表达。因此,反义 RNA 技术可根据需要调节基因的表达效率,甚至可以达到基因敲除的效果<sup>[9]</sup>。

## 1.2 反义寡核苷酸(Antisense oligonucleotides, AS-ODN)

反义寡核苷酸技术就是将一段可以与目的基因序列特异性结合的 13~25 nt 的单链寡核苷酸导入细胞,该序列与目的基因成碱基互补配对成为 DNA-RNA 双链,通过阻碍目的基因的表达,加速 mRNA 的降解,达到调控代谢的目的。

如何有效、特异地作用于目的 mRNA 是反义寡

核苷酸作用的关键。mRNA 常常形成链内的配对,阻碍反义寡核苷酸与目的 mRNA 结合,因此设计一定的序列长度十分重要。一般反义寡核苷酸与目的 mRNA 的大小比例约为 1:20<sup>[10]</sup>。寡核苷酸对核酸酶敏感,容易被降解<sup>[8]</sup>,近年来科研人员对反义寡核苷酸作了很多种类的化学修饰来提高反义寡核苷酸的稳定性,保护其不被核酸酶降解,提高抑制基因表达的效果,同时保持了对 RNA 酶 H 的激活作用。人们合成了硫代磷酸酯寡核苷酸(PS-AS-ODN)、混合骨架寡核苷酸的反义寡核苷酸、多肽-核酸嵌合体(peptide nucleic acid, PNA)等<sup>[11]</sup>多种修饰的反义寡核苷酸。经过修饰的反义寡核苷酸稳定性大大增加,细菌摄入后可达到反义作用的效果。Omid 等<sup>[12]</sup>将 PNA 添加到培养基中,达到了阻断 *hok* 基因的表达的效果。

人们还采取了其他方法,保护反义寡核苷酸不被降解。Patrick Fillion 等<sup>[13]</sup>将作用于半乳糖苷酶基因的反义寡核苷酸包裹在脂质体中,导入金黄色葡萄球菌,达到较好的抑制金黄色葡萄球菌基因表达的目的。

反义寡核苷酸在细菌遗传操作中已经得到了一定的应用,但细菌的繁殖速度快,反义寡核苷酸在细菌分裂过程中不能稳定地传递,而修饰的成本过高,应用范围较窄,因此目前反义寡核苷酸技术仍主要用于基础理论的研究。

## 1.3 核酶

核酶(Ribozyme)是具有催化活性的特殊的反义 RNA,它有高度专一内切核酸酶的活性,可与靶序列杂交并加以剪切,从而对基因表达进行调控,锤头型核酶是研究比较深入的一类。核酶的基本组成包括中间极为保守的核苷酸序列(活性中心)和两端的引导序列。

在实际应用中,核酶同样面临着稳定性和有效位点的选择等问题。对于核酶,提高稳定性的方法与 AS-ODN 类似,用化学方法对核酶进行的修饰来提高稳定性,保持酶活性<sup>[14]</sup>。在细菌中产生核酶的基因可以连接到载体上诱导产生核酶,从而持续调控目的基因的表达,但作用效果难以保证<sup>[15]</sup>。

在以上可用于细菌的反义技术中,反义 RNA 技术具有作用效果明显,可稳定的诱导表达,可随细胞的繁殖而分配到子细胞,作用效率可调节等其他

反义技术不能比拟的优点,更适合调控代谢细菌,因此反义 RNA 技术在细菌的代谢工程中应用最广。

细菌中不存在 RANi 现象,缺少相应的酶,所以 RNAi 技术不能用于细菌的遗传操作,但有研究表明细菌中有类似于真核生物 RNAi 的机制存在。Rodolphe 等发现噬菌体侵染细菌后,细菌基因组上出现了 25~40 bp 的重复空间体结构,这些成簇规则的有间隔短反向重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)参与了细菌抵御噬菌体核酸的过程,并且有效降解了噬菌体核酸<sup>[16]</sup>。随着细菌基因组研究的深入和细菌抵御外来核酸研究的累积,上述类似真核生物 RNAi 的机制很可能成为细菌的反义调控手段之一。

## 2 反义分子的设计

反义技术的应用主要有两个难点:第一,如何选择 RNA 分子的适当部位作为靶标;第二,反义分子的稳定性<sup>[17]</sup>。目前科研人员已经用化学方法设计了核酸肽等对反义分子进行修饰来增加其稳定性。因此设计选择适当的 mRNA 分子靶位点来抑制 mRNA 的翻译成为反义技术的核心问题。

最初人们设计反义分子是主要根据转录的起始位点、mRNA 翻译的起始位点,根据前人积累的实验经验,设计一系列反义分子,一一检测这些序列的作用效果,但是这样设计的反义分子在应用中效率不高<sup>[18]</sup>。目前反义分子的设计主要是采用以下 4 类方法:

### 2.1 RnaseH 分析

将一个随机或半随机的寡核苷酸库与 mRNA 进行杂交,然后用 RNaseH 酶切,对片段进行分析,筛选酶切效果较好的作为反义分子<sup>[19]</sup>。这种方法的缺点是工作量大,费时较多。

### 2.2 酶切图谱分析法设计反义分子

用多种特异性 RNA 酶酶切 RNA 的特定结构,据此可以得到 RNA 的结构信息。但是由于 RNA 的空间结构的阻碍,所以有的酶切不会完全,而且这种方法只适合于相对较短的 mRNA,而不适合分析序列较长的 mRNA<sup>[20]</sup>。

### 2.3 软件模拟分析

利用计算机软件可以预测 RNA 的二级结构,用于筛选靶位点时操作简便快捷,当前多种计算机软

件例如 mfold、RNAstructure、RNA draw、plotfold 等软件可以预测目的 mRNA 分子和反义分子相结合的三维结构,也可以预测反义分子在细胞内形成的空间结构<sup>[21]</sup>。预测的结果可以指导反义分子的设计。但计算机软件没有将 mRNA 与蛋白等因子的相互作用考虑进去,因此成功率不高<sup>[22]</sup>。

### 2.4 DNA 芯片技术应用于设计反义分子

应用 DNA 芯片技术,把设计的一系列反义分子粘附在芯片上,用标记的目的 mRNA 分子与芯片杂交,选择杂交度最高的反义分子<sup>[23]</sup>。此种方法效率高,效果好,但是成本较高。

目前人们设计反义分子,主要采用综合评价的方法,首先用软件模拟分析,设计一系列反义分子,然后酶切分析来验证或者采用芯片等技术来评价设计的反义分子的作用效果<sup>[24]</sup>。选择作用效果好的分子,最后才应用于抑制目的基因表达的实验。

## 3 反义技术作用效果的评估

检测反义分子在细胞内是否稳定可采用正义探针。主要是用正义探针与细胞杂交检测反义分子的丰度,从而确定反义分子是否稳定<sup>[25]</sup>。反义分子的作用效果则采用以下 4 种方法检测。

### 3.1 mRNA 水平的检验

目前应用的 mRNA 的检验方法有 Northern 印迹和荧光夹心原位杂交(Fluorescence sandwich hybridization assay, FSHA)等技术<sup>[26]</sup>,FSHA 能对 mRNA 进行较准确的定量分析<sup>[7]</sup>。随着芯片技术的推广,DNA 芯片也逐渐应用到分析反义分子作用下 mRNA 量的改变上来<sup>[27]</sup>。

### 3.2 蛋白水平的检测

反义技术的效果在蛋白水平上的检测主要采用免疫杂交技术,Western blotting 印记检测蛋白合成量的变化是在反义技术检测中应用较广的技术<sup>[5,21-23]</sup>。

### 3.3 代谢流量变化的分析

通过对代谢途径中间产物的检测可以确定反义分子在细胞内的表达是否改变了细胞的代谢流量,从而将代谢流作为一个评估反义分子作用效果的指标<sup>[5]</sup>。

### 3.4 细菌合成的底物和产物检测

反义技术的最终目的是通过对代谢途径中基因表达的调控来改变代谢产物的含量,因此对底物转

化率和产物产率的检测是必要也是最终的检测指标。例如: Papoutsakis 等利用反义 RNA 技术对丙酮丁醇梭菌中丁酸途径中的一系列基因进行调控, 检测了反义分子对于丁醇和丁酸合成量的影响<sup>[6]</sup>, 从而确定反义 RNA 技术可以很好的应用于调节丙酮丁醇梭菌的代谢调控。

目前对于反义技术作用效果的评价, 人们多将上述方法综合使用, 以 mRNA、蛋白水平、代谢流和产量的变化等作为综合评价指标。

## 4 反义技术的应用——机遇与挑战并存

从 1990 年到 2008 年发表的反义技术用于细菌的代谢调控的文章越来越多, 小 RNA 分子的发现和研究, 被《科学》杂志评选为 2006 年度十大科学进展之一。

虽然近 30 年来反义技术已经广泛应用于细菌的代谢工程领域中, 并且已经取得如此众多的成绩, 但是仍然处于发展初级阶段, 很多问题还没有研究清楚。第一, 从反义分子的应用效果来说, 反义分子的传递效果、调控效率等问题仍然需要深入的研究和探讨。反义分子与目标 mRNA 互补, 理论上应该是非常有效的, 但实际上是否有效互补取决于 2 个核酸序列的互补程度和细胞中的蛋白因子两方面的因素。所以目前还难以把反义分子对细胞整体代谢的影响做一个系统的评估。相信基因芯片、代谢组学手段等高通量筛选技术在反义技术效果评估中的进一步应用和技术革新会解决这些问题。因此对于反义技术对细胞的代谢调控的作用过程和检测方法、手段等还有待进一步研究。第二, 反义分子抑制基因表达程度的问题, 即抑制多少基因表达量才能达到预期目标。抑制量过多会导致代谢紊乱甚至菌体死亡, 抑制较少量的目的基因表达则起不到代谢调控的目的。第三, 从反义技术基础理论来说, 反义分子如果和细胞内其他基因或 mRNA 相互作用会导致难以预料的结果。从理论上讲反义技术的特点是专一性的调控, 但实际应用中反义分子在细胞中是否能特异的衰减目的分子还有待进一步的研究。Omid RF 等人发现用 PNA 作用于 *hok* 的 mRNA 会引发大肠杆菌自身的自杀机制, 导致菌体死亡<sup>[12]</sup>。这个问题目前的相关报道较少, 有待深入研究。

随着越来越多的有价值的细菌基因组测序的完成, 人们研究的重点已转向对基因功能的研究; 而且近年来代谢工程的迅猛发展也需要反义技术这样更精细的代谢调控手段, 因此反义技术无疑为功能基因组和代谢工程的研究提供了强有力的工具, 必将越来越多地应用于细菌等原核生物的代谢调控当中。

## REFERENCES

- [1] Shota A, Taizo H, James CL. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature*, 2008, **451**: 86–89.
- [2] Pitera DJ, Paddon CJ, Newman JD, *et al.* Balancing a heterologous mevalonate pathway for improved isoprenoid production in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2007, **9**: 193–207.
- [3] Zhu MM, Lawman PD, Cameron DC. Improving 1,3-propanediol production from glycerol in a metabolically engineered *Escherichia coli* by reducing accumulation of sn-glycerol-3-phosphate. *Biotechnol Prog*, 2002, **18**: 694–699.
- [4] Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, **75**: 280–84.
- [5] Christian K, Peter N. Antisense RNA based down-regulation of RNaseE in *E. coli*. *Micro Cell Fact*, 2006, **5**: 38.
- [6] Desai RP, Papoutsakis ET. Antisense RNA strategies for metabolic engineering of *clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(3): 936–945.
- [7] Engdahl HM, Hjalt T ÅH, Hjalt E, *et al.* A two unit antisense RNA cassette test system for silencing of target genes. *Nucl Acids Res*, 1997, **25**(16): 3218–3227.
- [8] Takanori K, Bakalova R, Hideki O. Antisense effects of DNA-peptide conjugates. *Nucl Acids Symp Ser*, 2003; **3**: 179–180.
- [9] Li KL, Charles MR. Antisense technology in molecular and cellular bioengineering. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, **14**: 505–511.
- [10] Stein CA. Keeping the biotechnology of antisense in context. *Nature Biotechnol*, 1999, **17**: 209.
- [11] Nathalie D, Stein CA. Antisense oligonucleotides: Basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther*, 2002, **3**(1): 347–355.
- [12] Faridani OR, Nikraves A, Pandey D, *et al.* Competitive inhibition of natural antisense Sok-RNA interactions activates Hok-mediated cell killing in *Escherichia coli*. *Nucl Acids Res*, 2006, **34**(20): 5915–5922.
- [13] Patrick F, Annie D, Khampoune S, *et al.* Encapsulation of DNA in negatively charged liposomes and inhibition of bacterial gene expression with fluid liposome-encapsulated

- antisense oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta*, 2001, **1515**(1): 44–54.
- [14] Usman N, Blatt LM. Nuclease-resistant synthetic ribozymes: developing a new class of therapeutics. *J Clin Invest*, 2000, **106**: 1197–120.
- [15] Michienzi A, Rossi JJ. Intracellular application of ribozymes. *Methods Enzymol*, 2001, **341**: 581–596.
- [16] Rodolphe B, Christophe F, Hélène D. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, **315**(5819): 1709–1712.
- [17] Mao JP, Zicai L, Mao BZ. For mRNA accessible sites screening: A comparative study by using MAST and computational prediction. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2004, **20**(3): 399–407.  
毛建平, 梁子材, 毛秉智. 软件预测和 MAST 技术筛选 mRNA 反义核酸靶点的比较. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, **20**(3): 399–407.
- [18] Bing W, Howard KK. Assessment of the utilization of the antisense RNA strategy to identify essential genes in heterologous bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, **220**: 171–176.
- [19] Ho SP, Bao YJ, Leshert T. Mapping of RNA accessible site for antisense experiments with oligonucleotide libraries. *Nature Biotechnol*, 1998, **16**, 59–63.
- [20] Patrick SW, Gregory NS, Martin LY, et al. Thermodynamic and kinetic characterization of antisense oligodeoxynucleotide binding to a structured mRNA. *Biophys J*, 2002, **82**(1): 366–377.
- [21] Seshu BT, Welker NE, Papoutsakis ET. Design of antisense RNA constructs for downregulation of the acetone formation pathway of *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol*, 2003, **185**(6): 1923–1934.
- [22] Ho SP, Britton DH, Stone BA. Potent antisense oligonucleotides to the human multidrug resistance mRNA are rationally selected by mapping RNA-accessible sites with oligonucleotide libraries. *Nucl acids Res*, 1996, **24**: 1901–1907.
- [23] Milner N, Mir KU, Southern EM. Selecting effective antisense reagents on combinatorial oligonucleotide arrays (see comments). *Nature Biotechnol*, 1997; **15** (6): 537–541.
- [24] Kuss B, Cotter F. Antisense-time to shoot the messenger. *Ann Oncol*, 1999, **10**: 495–503.
- [25] Jacoba GS, Gerhart EH. Loop swapping in an antisense RNA/Target RNA pair changes directionality of helix progression. *J Biol Chem*, 2003, **37**(278): 35558–35563.
- [26] Neubauer A, Soini J, Bollok M, et al. A fermentation process for tetrameric human collagen prolyl 4-hydroxylase in *Escherichia coli*: Improvement by gene optimisation of the b-subunit and repeated addition of the inducer anhydrotetracycline. *J Biotechnol*, 2007, **128**(2): 308–312.
- [27] Seshu BT, Stefan GJ, Eleftherios TP. Antisense RNA downregulation of coenzyme A transferase combined with alcohol-aldehyde dehydrogenase overexpression leads to predominantly alcohologenic *Clostridium acetobutylicum* fermentations. *J Bacteriol*, 2003, **185**(12): 3644–3653.

### 本期广告索引

企业	版位	企业	版位
默克化工技术(上海)有限公司	封底	生物谷网站	内页
Roche 诊断产品有限公司	封二	上海国强生化工程装备有限公司	内页
富士胶片(中国)投资有限公司	封三, 内页	镇江东方生物工程公司	内页
美国 Promega 公司	内页	赛默飞世尔科技有限公司	内页
杭州博日科技有限公司	内页	汕头大学多学科研究中心招聘启事	内页